

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16371

研究課題名（和文）大腸癌における癌周囲微小環境に着目した薬剤耐性機構の解明と治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of drug resistance in colorectal cancer focusing on the peri-tumour microenvironment and its application to treatment

研究代表者

志賀 一慶 (shiga, kazuyoshi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：20747282

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：癌組織は癌細胞とその周囲間質細胞から構成される。その間質の主成分であるのが癌関連線維芽細胞である。

今回我々が明らかにしたものは癌関連線維芽細胞から様々なタンパクが分泌され癌細胞の増殖、浸潤、血管新生に多大な影響を与えていることを証明した。例えばインターロイキン6が癌細胞の増殖に関与していること、インターロイキン8やCCL2が癌細胞の遊走や浸潤に関与していること、インターロイキン6や8、CHI3L1タンパクが血管新生に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は今までの癌細胞のみに特化した研究とは異なり癌組織内に存在する癌細胞周囲の間質細胞と癌細胞の相互作用による癌進展の機序の解明を目的とした事である。また社会的意義に関してはその機序を解明することで抗腫瘍薬の効果の増強や耐性化に関する機序を解明することによって今までにない新たな治療方法の確立を目指すことにある。抗腫瘍効果の耐性化の打破が可能となればさらなる予後の改善や既存の抗腫瘍薬の効果の延長につながり、医療費の高騰にも歯止めがかかることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer tissue is composed of cancer cells and their surrounding stromal cells. Cancer-associated fibroblasts are the main component of the stroma.

Our findings demonstrate that cancer-associated fibroblasts secrete a variety of proteins that have a profound effect on cancer cell proliferation, invasion and angiogenesis. For example, interleukin 6 is involved in cancer cell proliferation, interleukin 8 and CCL2 are involved in cancer cell migration and invasion, and interleukin 6, 8 and CHI3L1 proteins are involved in angiogenesis.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 癌関連線維芽細胞 癌増殖 癌浸潤 血管新生 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌治療において癌の進展機序を解明することは必要不可欠である。既存の癌研究は癌細胞のみに焦点をあてていたが癌組織には癌細胞のみならず間質が存在する。その間質の主成分である線維芽細胞は癌関連線維芽細胞とよばれ癌細胞の進展に多大な影響を与えている事がわかってきた。しかしながらその役割は十分には解明されていない。

一方で癌治療において重要である抗腫瘍薬の耐性化についても十分解明されていないのが現状である。抗腫瘍効果については *in vivo* よりも *in vitro* において優れているとの報告もあり抗腫瘍薬の耐性化に癌関連線維芽細胞が関与しているのではないかと推測される。

2. 研究の目的

これまでの抗腫瘍薬は癌細胞自体に着目したものばかりであり、癌周囲環境に注目し、ターゲットとした治療薬については未だ臨床応用されていない。本研究の目的はこれまで臨床応用されてこなかった癌細胞と癌間質細胞との相互作用を断ち切り、癌の進展を抑制することである。癌関連線維芽細胞による抗腫瘍薬耐性の機序を解明できれば大腸癌だけではなく、他の固形癌の抗腫瘍薬の効果を増強することにもつながる。ひいては高額な新規抗腫瘍薬の乱用にも歯止めがかかり高騰する医療費の減額に貢献することもできると考えている。

3. 研究の方法

● 癌細胞と癌関連線維芽細胞との単離、ならびに相互作用の解明

癌関連線維芽細胞を臨床検体より単離、培養することは既に手技を確立しており今回も同様な手技で行う。単離、培養された細胞が癌関連線維芽細胞であることを免疫染色で確認する。どのようなタンパクが癌関連線維芽細胞より分泌されているか培養上清を用いて調べる。また細胞の total RNA を採取してマイクロアレイアナライシスで発現についても調べる。

相互作用の解明については癌の増殖、浸潤、血管新生にしばって調べていく。

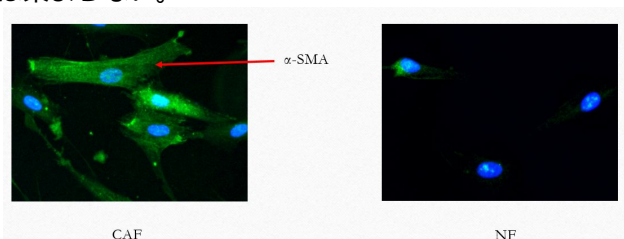
● 薬剤耐性の機序の解明

癌関連線維芽細胞の特徴が解明されつつあり今後は薬剤耐性との関連について研究をすすめていく予定である。

4. 研究成果

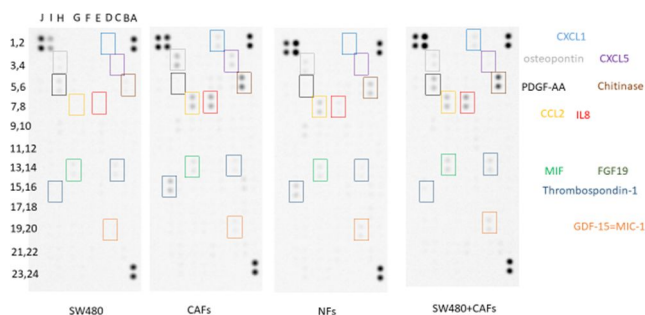
薬剤耐性機序の解明については癌関連線維芽細胞の特性を解明する必要があり時間的な制約もあり癌関連線維芽細胞の特性をつかむ研究を重点的に行った。

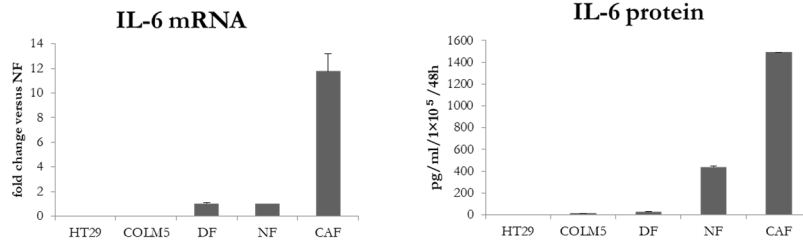
● 癌関連線維芽細胞の単離、培養：癌関連線維芽細胞の特徴として SMA が強陽性となるが正常線維芽細胞は染まらない。



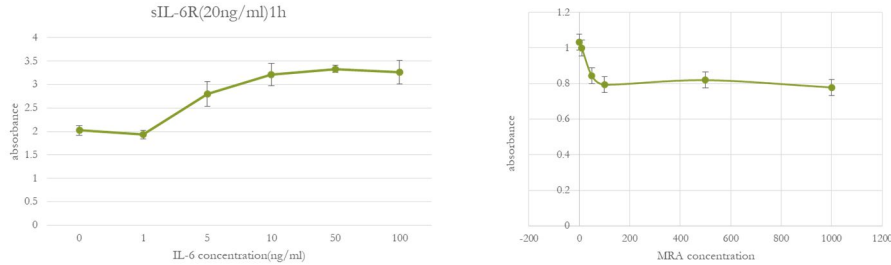
● 癌関連線維芽細胞の特性

大腸癌細胞株 (SW480) と正常線維芽細胞 (NF) よりも癌関連線維芽細胞 (CAF) から IL-6、IL-8、Chitinase3、CCL2 が多く分泌されており癌細胞からはあまり分泌されていない。

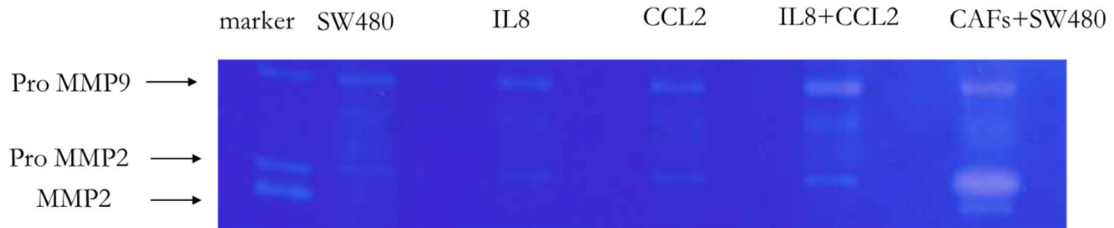
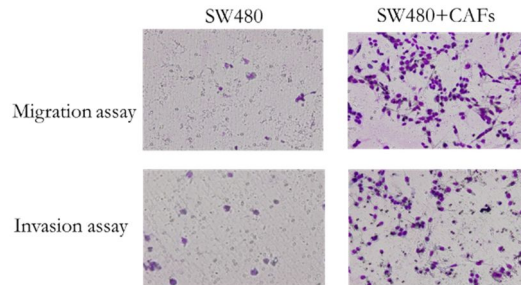




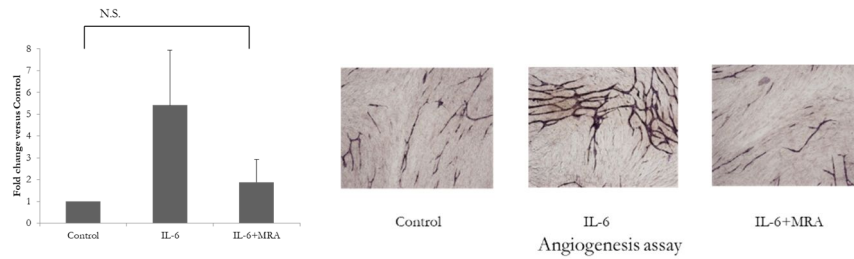
増殖能 (WST-1 assay): 大腸癌細胞株に IL6 を加えると濃度依存的に細胞増殖が著名となり MRA(IL-6 の中和抗体)を加えると細胞増殖が抑制された。癌関連線維芽細胞から分泌された IL-6 が細胞増殖に影響を与えている。



浸潤能 (浸潤アッセイ、ザイモグラフィ): 癌細胞単独 (SW480) よりも癌細胞と癌関連線維芽細胞 (SW480+CAF s) を共培養した方が遊走能、浸潤能ともに亢進した。また IL-8 と CCL2 を投与すると癌細胞単独よりも浸潤能に関与するといわれている MMP2 の発現が亢進した。



血管新生: IL-6 を投与することによって血管新生因子である VEGF の分泌が亢進した。また angiogenesis assay において管腔形成能も亢進した。



● 薬剤耐性の機序の解明

薬剤耐性に関与している可能性は示唆されたがそのメカニズムまでは解明できず。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ando N	4. 巻 42
2. 論文標題 Eicosapentaenoic acid suppresses angiogenesis via reducing secretion of IL-6 and VEGF from colon cancer-associated fibroblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 339-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2019.7141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroki Takahashi	4. 巻 50
2. 論文標題 Accurate localization of rectal cancer using near infrared ray-guided surgery with intra-operative colonoscopy and da Vinci Firefly technology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 205-208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-019-01864-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masayasu Hara	4. 巻 49
2. 論文標題 No inflammatory benefit obtained by single-incision laparoscopic surgery for right hemicolectomy compared with conventional laparoscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 339-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-019-01777-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroki Takahashi	4. 巻 49
2. 論文標題 Laparoscopic extraperitoneal sigmoid colostomy using the totally extraperitoneal hernia repair technique after abdominoperineal resection for rectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 621-628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-019-01814-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田祐三, 高橋広城, 柳田 剛, 仲井 希, 安藤菜奈子, 志賀一慶, 廣川高久, 原 賢康, 石黒秀行, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 Tumor Progressionに伴うBcl-2ファミ リー蛋白の変化とそれらをターゲットとした治療の有効性の検討
3. 学会等名 第51回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田祐三, 高橋広城, 原 賢康, 廣川高久, 志賀一慶, 安藤菜奈子, 柳田 剛, 仲井 希, 石黒秀行, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 STAT3/Bcl-xL/Mcl-1シグナルを介したApigeninによる大腸がんアポトーシス誘導効果の検討
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤菜奈子, 原 賢康, 志賀一慶, 柳田 剛, 仲井 希, 前田祐三, 廣川高久, 高橋広城, 石黒秀行, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 In vitroにおけるcolon cancer-associated fibroblastから産生されるIL-6とVEGFに対するEPAの抑制効果とそれに伴う血管新生抑制
3. 学会等名 第26回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲井 希, 原 賢康, 安藤菜奈子, 柳田 剛, 前田祐三, 廣川高久, 志賀一慶, 高橋広城, 石黒秀行, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 大腸癌におけるbevacizumab療法とVEGF-A/PlGF産生に関する免疫組織学的検討
3. 学会等名 第26回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原賢康, 柳田剛, 高須惟人, 安藤菜奈子, 仲井希, 前田祐三, 廣川高久, 志賀一慶, 高橋広城, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 Bevacizumabによる大腸癌化学療法治療患者の血漿VEGF値の推移と治療効果
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志賀一慶, 原賢康, 柳田剛, 高須惟人, 安藤菜奈子, 仲井希, 前田祐三, 廣川高久, 高橋広城, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 遊離癌細胞の観点からみた局所進行直腸癌に対する術前治療の効能
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志賀一慶, 原賢康, 高須惟人, 仲井希, 前田祐三, 廣川高久, 高橋広城, 小川了, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 術中洗浄腹水CEA mRNA測定は直腸癌術後の局所再発危険因子となり得るか?
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志賀一慶
2. 発表標題 直腸癌術後の局所再発予測因子として術中洗浄液中のCEA mRNA測定の有用性
3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志賀一慶, 原賢康, 柳田剛, 前田杏梨, 鈴木卓弥, 仲井希, 前田祐三, 廣川高久, 小川了, 高橋広城, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 腹腔鏡下直腸癌手術における術中露出癌細胞の観点から見た術前化学放射線療法の効能
3. 学会等名 第32回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木卓弥, 廣川高久, 前田杏梨, 柳田剛, 仲井希, 前田祐三, 志賀一慶, 小川了, 原賢康, 高橋広城, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 p53変異大腸癌細胞株に対するATR阻害剤併用によるTAS-102の効果
3. 学会等名 第53回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志賀一慶, 原賢康, 前田杏梨, 柳田剛, 鈴木卓弥, 仲井希, 前田祐三, 廣川高久, 小川了, 高橋広城, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 局所進行直腸癌手術における術中露出癌細胞の観点からみた術前化学放射線療法の効能
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木卓弥, 廣川高久, 前田杏梨, 柳田剛, 仲井希, 前田祐三, 志賀一慶, 小川了, 原賢康, 高橋広城, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 G2/M期チェックポイント阻害剤併用による大腸癌細胞株に対するTAS-102の効果
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田杏梨, 高橋広城, 前田祐三, 鈴木卓弥, 仲井希, 柳田剛, 志賀一慶, 廣川高久, 小川了, 原賢康, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 大腸癌微小環境における抗アポトーシス蛋白とCAFとの関連
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志賀一慶, 前田杏梨, 渡部かをり, 柳田剛, 鈴木卓弥, 前田祐三, 廣川高久, 小川了, 高橋広城, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 直腸癌手術における術中遊離癌細胞の検出と局所再発の関連
3. 学会等名 第18回日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志賀一慶, 前田杏梨, 柳田剛, 鈴木卓弥, 前田祐三, 廣川高久, 高橋広城, 小川了, 松尾洋一, 瀧口修司
2. 発表標題 直腸癌における術中漏出癌細胞の観点からみた局所再発予測因子
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木卓弥, 廣川高久, 前田杏梨, 柳田剛, 仲井希, 前田祐三, 志賀一慶, 原賢康, 高橋広城, 瀧口修司
2. 発表標題 フッ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤耐性大腸癌細胞株に対するATR阻害剤を併用した5-FUの効果
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田 杏梨、高橋 広城、前田 祐三、鈴木 卓弥、柳田 剛、志賀 一慶、廣川 高久、小川 了、松尾 洋一、瀧口 修司
2. 発表標題 大腸がん微小環境における IL-6/STAT3シグナルを介する抗アポトーシス蛋白変化とCAFとの関連
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関